



# 肺腺癌におけるOvarian cancer immuno-reactive antigen domain containing 2 (OCIAD2) 発現の臨床病理学的意義および機能解析

著者	坂下 麻衣
発行年	2020
学位授与大学	筑波大学 (University of Tsukuba)
学位授与年度	2019
報告番号	12102甲第9542号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2241/00160977">http://hdl.handle.net/2241/00160977</a>

氏 名	坂下麻衣		
学 位 の 種 類	博士（医学）		
学 位 記 番 号	博甲第 9542 号		
学位授与年月	令和 2 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審 査 研 究 科	人間総合科学研究科		
学 位 論 文 題 目	肺腺癌における Ovarian cancer immuno-reactive antigen domain containing 2 (OCIAD2) 発現の臨床病理学的意義および機能解析		
主 査	筑波大学教授	博士（医学）	関根 郁夫
副 査	筑波大学准教授	博士（薬学）	鈴木 裕之
副 査	筑波大学准教授	医学博士	坂本 透
副 査	筑波大学講師	博士（医学）	菊池 慎二

## 論文の内容の要旨

坂下麻衣氏の博士学位論文は、肺腺癌における Ovarian cancer immuno-reactive antigen domain containing 2 (OCIAD2)発現と臨床病理学的因子との関連を通して肺腺癌の成り立ちに迫るものであり、その要旨は以下のとおりである。

### （目的）

著者らの研究室は従来より肺腺癌の組織学的多段階発癌過程を研究し、その結果は WHO 肺腺癌組織分類に反映されている。2007 年には Ovarian cancer immuno-reactive antigen domain containing 2 (OCIAD2) の発現が上皮内腺癌と比較して初期浸潤癌に有意に高いことを報告し、肺腺癌の初期悪性化に関与する因子として注目されている。OCIAD2 は OCIAD1 と相同性が高い 7 個のエクソンを持つ遺伝子として同定され、154 アミノ残基から構成される分子量 16954Da の蛋白質をコードしている。OCIAD1 蛋白は癌細胞の接着・遊走や化学療法抵抗性に関与することが示されているが、OCIAD2 についての報告は少ない。著者は、肺腺癌症例における OCIAD2 発現と臨床病理学的特徴の関連と OCIAD2 の機能を明らかにする目的で本研究を行っている。

### （方法）

著者は、1999 年から 2007 年に筑波大学附属病院で外科切除された肺腺癌標本 191 例を用いて tissue microarray (TMA) を作成している。次に著者は、ウサギポリークローナル抗 OCIAD2 抗体と 2 次抗体を用いて免疫組織化学染色を行い、OCIAD2 の発現を H-score を用いて定量化している。H-score と臨床病理学的特徴の関連は、 $\chi^2$  検定を用いて評価している。さらに著者は、ROC 曲線から得られたカットオフ値により H-score 130 点以上を高発現群 (n=75)、H-score 130 点未満を低発現群 (n=116) とし、両群間で臨床病理学的特徴を比較している。生存期間は Kaplan-Meier 法を用いて解析し、log-rank テストで統計学的有意性の有無を評価している。OCIAD2 の機能解析として、著者は、肺腺癌細胞株 A549 (KRAS 遺伝子変異あり)、HCC827 (EGFR 遺伝子変異あり) を含む複数の肺癌細胞株を培養し、OCIAD2 の発現を RT-PCR とウエスタンブロットで評価している。OCIAD2 に特異的な siRNA または scrambled RNA (コントロール) を核酸導入試薬によりトランスフェクションし、その後 WST-8 細胞増殖アッセイを行っている。次に著者は、蛍光免疫染色のために 1 次抗体として抗

OCIAD2 抗体またはミトコンドリアマーカーとして抗 voltage-dependent anion-selective channel protein 1 (VDAC1) 抗体を用い、2 次抗体で蛍光標識した後にプレパラートを封入している。透過型電子顕微鏡による観察のために標本をグルタルアルデヒド前固定、四酸化オスミウム固定、エタノール脱水、プロピレンオキシド置換、エポン包埋した上で、超薄切切片を作製し、酢酸ウラン染色、鉛染色による二重染色を行っている。

#### (結果)

著者は、OCIAD2 蛋白は肺腺癌細胞の胞体内に顆粒状を呈し、血管侵襲 ( $p=0.0018$ )、リンパ管侵襲 ( $p=0.049$ )、T 因子 ( $p=0.0024$ )、病期 ( $p=0.0003$ )と関連することを示している。OCIAD2 蛋白発現は、上皮内腺癌、微少浸潤性腺癌、置換型腺癌、その他の浸潤癌の順に高く、一つの腫瘍の中では浸潤部で非浸潤部よりも高い傾向にあることを示している。*EGFR* 遺伝子変異陽性腺癌では *EGFR* 野生型の腺癌よりも OCIAD2 蛋白発現が高く、ALK 蛋白発現の有無とは関連が無いことを示している。著者は、全肺腺癌患者において ( $n=191$ )、OCIAD2 蛋白高発現群と低発現群で無病生存期間(DFS)に差は無く [ハザード比(HR): 1.38、95%信頼区間(95%CI): 0.83-2.35]、全生存期間(OS)は高発現群で悪いこと (HR: 1.63、95%CI: 1.05-2.68) を示している。TTF-1 陽性患者 ( $n=161$ ) においては、DFS (HR: 1.65、95%CI: 1.07-2.89)、OS (HR: 1.83、95%CI: 1.14-3.25) 共に OCIAD2 蛋白高発現群で悪いことを示している。

次に著者は、OCIAD2 mRNA 及び蛋白発現はどちらも A549 では低く HCC827 では高いことを示している。siRNA によって OCIAD2 をノックダウンすると、A549 では cleaved PARP と cleaved caspase-3 が誘導されると共に細胞増殖が抑制され、HCC827 では細胞増殖が亢進することを示している。

さらに著者は、コントロール A549 株における VDAC1 と OCIAD2 の蛍光免疫染色では両者ともに核周囲に広がりマージすることを示している。OCIAD2 をノックアウトした A549 株の蛍光免疫染色では OCIAD2 および VDAC1 のシグナル強度は共に減少し細胞質内に散在した。著者は、電子顕微鏡による観察では OCIAD2 をノックアウトした A549 株のミトコンドリアは細胞質内に散在し、1 細胞当たりのミトコンドリア数および 1 ミトコンドリア当たりのクリステ数は著明に減少し不明瞭となることを示している。

#### (考察)

著者は、OCIAD2 発現が浸潤部で陽性、非浸潤部で陰性となる傾向がみられ、非浸潤性癌から浸潤性癌となるにつれて高発現となること、病理学的予後不良因子と関連し、OCIAD2 高発現群では低発現群に比べて生存期間が短いことから、肺腺癌の多段階発癌の過程に関与している可能性があると考えしている。OCIAD2 の肺腺癌細胞増殖に対する影響では A549 と HCC827 では異なる結果が得られたが、*EGFR* 遺伝子変異を有する腺癌では OCIAD2 の機能が *EGFR* 野生型の腺癌とは異なる可能性があるとしている。OCIAD2 の細胞内局在はミトコンドリアであることが確認され、その形態維持に関与していると考えしている。

### 審査の結果の要旨

#### (批評)

本研究は、肺腺癌臨床病理標本における OCIAD2 発現および臨床病理学的因子との関連と、OCIAD2 の細胞内局在・機能解析の大きく 2 つの仕事から成っている。すでに前半は英文論文として発行され十分な内容を持っている。後者も蛍光免疫染色や電子顕微鏡など形態学に立脚した研究でそのような研究はほとんど例を見ない。本研究の特徴は、肺腺癌の組織形態や細胞形態にしっかり立脚して研究が為されていることで、癌組織内の不均一性から発した肺腺癌進展の総合的理解に大きな一石を投じた。

令和 2 年 1 月 7 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。よって、著者は博士 (医学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。